



2013 년 2월

석사학위 논문

# Sestrin2 유도를 통한 Resveratrol 의 LXRα 매개성 지질 생합성 억제 효능

# 조선대학교 대학원

약 학 과

진 소 희

# Sestrin2 유도를 통한 Resveratrol 의 LXRα 매개성 지질 생합성 억제 효능

The effect of resveratrol on LXRα-induced lipogenesis via *Sestrin2* gene induction

2013 년 02 월 25 일

# 조선대학교 대학원

약 학 과

진 소 희

# Sestrin2 유도를 통한 Resveratrol 의 LXRα 매개성 지질 생합성 억제 효능

지도교수 기 성 환

이 논문을 약학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2012 년 10 월

조선대학교 대학원

약 학 과

진 소 희

# 조선대학교 대학원

2012 년 11 월

위	원	조선대학교	교수	신상미	인
위	원	조선대학교	교수	기성환	인

위원장 조선대학교 교수 최홍석 인

# 진소희의 석사학위논문을 인준함

# CONTENTS

List of Figures List of Abbreviations					
I. k	론3				
피.지	료 및 방법5				
1.	시약 및 재료				
2.	세포주 배양				
3.	Primary 간세포 분리				
4.	실험 동물 및 식이				
5.	Immunoblot 분석법6				
6.	젤 이동 분석법				
7.	실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응법6				
8.	Transfection				
9.	Oil Red O 염색법7				
10.	통계처리8				
Ⅲ. 싙	」 험결과9				
1.	Primary hepatocyte 및 HepG2 세포에서 resveratrol에 의한 지질 축적 및 SREBP-1c 발현 억제효과9				
2.	LXRα활성과 LXRα 의존적 유전자 전사촉진에 의한 Resveratrol의				

## Ⅳ. 고찰 및 결론.....12

# 

### **List of Figures**

- Figure 1. Resveratrol inhibits T090-induced triglyceride accumulation in primary hepatocytes.
- Figure 2. Resveratrol inhibits T090-induced SREBP-1c induction and its target genes.
- **Figure 3.** Resveratrol inhibits LXRα activation and LXRα-dependent LXREluciferase activity.
- **Figure 4.** Resveratrol's effects on LXRα-mediated SREBP-1c repression were independent on SIRT1 and AMPK activation.
- Figure 5. Sestrin2 levels were down-regulated in HFD-induced fatty liver.
- Figure 6. Resveratrol up-regulated the expression of *Sestrin2* in hepatocytes.
- Figure 7. The role of *Sestrin2* in the LXR $\alpha$ -mediated SREBP-1c induction.

## **List of Abbreviations**

LXRa: Liver X receptor-a SREBP-1c: Sterol regulatory element binding protein-1c Sirt1: Sirtuin1 NAFLD: Nonalcoholic fatty liver disease FAS: Fatty acid synthase ACC: Acetyl-CoA carboxylase SCD-1: Stearoyl-CoA desaturase-1 Resveratrol: 3,4',5-trihydroxystilbene AMPK: AMP-activated protein kinase SOD: Superoxide dismutase FRAP: Ferric reducing ability of plasma NASH: Nonalcoholic steatohepatitis LXRE: Liver X receptor elements HFD: High-fat diet Sesn2: Sestrin2 RXR: Retinoid X receptor DN-AMPK: Dominant-negative AMP-activated protein kinase T090: T0901317 GW: GW3965 ROS: Reactive oxygen species RNS: Reactive nitrogen species Nrf2: NF-E2-related factor 2

### ABSTRACT

# The effect of resveratrol on LXRα-induced lipogenesis via Sestrin2 gene induction

Jin, So Hee

Adviser: Prof. Ki, Sung Hwan, Ph.D.

College of Pharmacy

Graduate School of Chosun University

Liver X receptor- $\alpha$  (LXR $\alpha$ ), a member of the nuclear receptor superfamily of ligandactivated transcription factor, regulates *de novo* fatty acid synthesis that leads to stimulate hepatic steatosis. Although, resveratrol, a polyphenol in grapes, has beneficial effects on metabolic disease, but it is not known whether resveratrol affects LXR $\alpha$ -dependent lipogenic gene expression. This study investigated the effect of resveratrol in LXR $\alpha$ -mediated lipogenesis and the identification of the molecular mechanism. Resveratrol treatment attenuated LXR $\alpha$  agonist (T0901317)-mediated hepatic fat accumulation in primary hepatocytes. Resveratrol inhibited the ability of LXR $\alpha$  to activate sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) and thereby target genes expression (e.g., FAS, ACC, SCD-1) in hepatocytes. Moreover, resveratrol decreased LXR $\alpha$ -RXR $\alpha$  DNA binding activity and LXRE-luciferase (CYP7A1) transactivation. Resveratrol was known to activate Sirtuin 1 (Sirt1) and AMP-activated protein kinase (AMPK) although precise mechanism of action remains controversial yet. We found that the ability of resveratrol to repress T0901317-induced SREBP-1c expression was not dependent on SIRT1 and AMPK activation. Treatment of chemical inhibitor or overexpression of dominant negative mutant plasmid fails to reverse resveratrol-mediated effects on LXR $\alpha$ -mediated SREBP-1c suppression. It is well established that hepatic steatosis is associated with antioxidant and redox signaling. Surprisingly, novel antioxidant protein *sestrin2* expression is significantly down-regulated in the livers of high fat diet-fed mice compare to normal chow-fed diet. Morevover, resveratrol up-regulated *sestrin2* expression, but not sestrin1 and sestrin3 expression. *Sestrin2* overexpression repressed LXR $\alpha$ activated SREBP-1c expression and LXRE-luciferase activity, suggesting that involvement of *sestrin2* in the LXR $\alpha$ -mediated lipogenic gene expression. Our results showing that resveratrol has an effect of *sestrin2* gene induction and contributing to the inhibition of LXR $\alpha$  -mediated hepatic lipogenesis.

#### I.서 론

비 알코올성 지방간 질환(Nonalcoholic fatty liver disease)은 가장 흔한 간 질환중 하나이며 의학적으로 지방이 전체 간 무게의 5% 이상을 초과하는 병적 상태를 지칭한다. 지방간을 야기시키는 가장 흔한 요소로는 알코올과 대사 증후군(비만, 인슐린 저항성, 심혈관 질환 등의 복합적 질병 군)이 있다. 초기 지방간 자체는 심각한 문제를 초래하지 않지만 지방간이 심화되면 간염, 간섬유증, 간경변증, 간암으로 진행되어 생명의 위협을 초래할 수 있다. 지방간은 간세포에 지질이 축적되는 현상으로 간 내 지질생합성의 증가, 합성된 지질의 배출억제, 외부지방조직의 간 내 유입 등의 기전으로 정의 할 수 있다.

LXRα(Liver X receptor-α)는 리간드에 의해 활성화되는 핵 수용체의 일종이다. LXRα 의 활성화는 간에 지질생합성을 증가 시켜 지방간증과 고중성지질 혈증을 일으키며[1] 인슐린에 의한 지질 생합성 증가에 LXRα 활성화가 관련되어 있음이 활성은 항상성 알려져 있다[2]. 또한 LXRα 콜레스테롤 유지에 관련된 유전자(CYP7A1, ABCA1, ABCG1) 발현을 조절한다[3,4]. SREBP-1c(Sterol regulatory element binding protein-1c)는 LXRα 활성화에 의해 유도되는 주요한 표적 유전자이자 지질 유전자발현 조절에 있어 핵심 전사인자이다. LXRα 수용체는 SREBP-1c 를 활성화하여 표적 유전자인 fatty acid synthase(FAS), acetyl-CoA carboxylse(ACC), stearoyl-CoA desaturase-1(SCD-1) 과 같은 지질유전자 발현을 증가 시킨다[5,6]. 그러므로 LXRα-SREBP-1c 경로는 비 알코올성 지방간증을 예방하거나 치료하는데 있어 매력적인 표적이 될 수 있다[7.8].

Resveratrol(3,4',5-trihydroxystilbene)은 포도씨 등에 풍부한 천연 폴리페놀성분이며 항산화, 항암, 항염증 효능 등이 알려져 있다[9,10]. Resveratrol 이 심혈관 질환, 신장질환, 암 등 여러 질환에 효능이 있다고 알려져 있지만[11]. 그 명확한 기전에 대해서는 아직 논쟁중 이다. 지금까지 알려진 resveratrol 의 효능은 Sirtuin1(SIRT1) 활성 의존적으로 세포기능을 직접적 또는 간접적으로 조절하는 것이다[12,13]. SIRT1 은 PGC-1 활성과 발현조절[12], LKB1 의 활성화 및 탈 아세틸화를 통한 AMPK 활성을 조절한다[14]. 그러나 LXRα-활성에 의한 지질 생성에 있어서 resveratrol의 효능 및 AMPK/SIRT1 신호의 역할에 대해 아직 밝혀진 바 없다.

비 알코올성 지방간 동물모델에서 높은 자유 라디칼 활성이 나타나며

3

미토콘드리아에서 superoxide 및 hydrogen peroxide 생성이 증가 되어 있음이 여러 차례 보고 된 바 있다[15,16]. 또한 비 알코올성 지방간 환자에게서는 glutathione level, Superoxide dismutase(SOD) 활성 그리고 Furric reducing ability of plasma (FRAP)등의 항산화 효소의 활성이 억제 되어 있음이 보고된 바 있다[17]. 최근 연구에 의하면 *Sestrins(Sesns*)은 새로운 항산화 유전자로 규명되었다. *Sesns* 은 저산소증, DNA 손상, hydrogen peroxide 등의 외부 스트레스에 의해 유도되어 세포를 보호한다 [18,19]. 본 연구에서는 Resveratrol 에 의한 LXRα-의존적 간 지질 생성 억제효능 및 *Sesn2* 유전자 유도가 LXRα 활성화에 미치는 영향을 밝히고자 하였다.

#### Ⅱ. 실험재료 및 방법

#### 1. 시약 및 재료

SREBP-1c Antibody 는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. Anti-β-actin antibody, anti-c-myc antibody, resveratrol, daidzein, genistein and GW3965는 Sigma(St. Louis, MO)에서 구입하였다. Anti-FAS antibody, Anti-ACC antibody는 Cell Signaling(Beverly, MA)에서 구입하였다. *Sestrin2* antibody는 Proteinteck(Chicago, IL)에서 구입하였다. T0901317(T090), compound C는 Calbiochem(San Diego, CA)에서 구입 하였다.

#### 2. 실험 세포주 배양

HepG2 세포는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA)에서 구입하여 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 50 units/ml penicilin 및 50 g/ml streptomycin 이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다. 세포 군집이 약 70~80%의 밀도를 갖도록 하였다.

#### 3. Primary 간세포 분리

ICR 마우스는 Zoletil을 이용하여 마취 시킨 뒤 무균상태에서 간 문정맥에 케뉼러를 삽입하였다. 간은 0.05% collagenase가 포함된 HBSS를 20분, Ca<sup>2+</sup> 10 ml/min의 비율로 관류 시켰다. 관류후 얻어진 간은 멸균된 PBS로 세척후 잘라 갈았다[20]. 세포 서스펜션은 여과기를 이용하여 필터 하였고 5분 동안 원심분리 시켜 실질조직과 비 실질 조직으로 나눴다. 얻은 간세포는 10% FBS, 50 units/ml penicilin 및 50 g/ml streptomycin 이 함유된 DMEM으로 배양 하였다.

#### 4. 실험 동물 및 식이

Male C57BL/6 마우스는 Charles River Orient (Seoul, Korea)에서 제공받았으며, 1주일 동안 25℃ 온도에 적응시켰다. 정상식이(normal diet)와 고지방식이(high-fat diet)로 8주 동안 실시 하였다. 간 조직샘플을 얻어 Sestrin mRNA 및 단백질 level을 측정 하였다.

5

#### 5. Immunoblot 분석법

획득한 세포 분획의 단백질을 Mighty Small II SE 250 장치(Hoefer, Inc., San Francisco, CA)를 이용하여 sodium dodecylsulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 방법으로 분리 하였다[21]. 시료를 시료희석완충액 [pH 6.8 Tris, 10% glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 0.0013% bromophenolblue] 에 희석하여 7.5%의 젤을 사용하여 전기 완충액(0.12 M Tris, 0.96M glycine, 0.5% SDS)내에서 전기영동 하였다. 전기 영동이 끝난 젤은 전기영동 전달장치를 이용하여 전이 완충액(25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% v/v methanol, pH 8.3)내에서 190 mA 로 1시간 10분 동안 nitrocellulose지에 단백질을 전이시켰다. 관찰하려는 단백질에 대한 1차 항체와 반응시킨 후 이어 Horseradish peroxidase(HRP)와 결합되어 있는 2차 항체와 1시간 반응시키고 ECL chemiluminescence (Amersham Biosciences, Bucking hamshire, UK)를 이용하여 발색하였다.

#### 6. 젤 이동 분석법

SREBP1-1c binding site(5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3')의 이중결합 DNA probe를 사용하였고 probe는 [γ<sup>32</sup>P]ATP 와 T4 polynucleotide kinase로 표지하였다. 20% glycerol 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM NaCl, 2.5 mM dithiothreitol, 0.25 mg/ml poly(dI-dC) and 50 mM Tris-Cl (PH 7.5)를 포함하는 5X binding buffer와 15-30 µg의 핵 분획을 1 µl의 probe (10<sup>6</sup>cpm)와 30분간 실온에서 반응시켰다. 샘플은 4% polyacrylamide 젤에서 100 V의 전압으로 분리되었으며 고정, 건조 후 방사능을 측정하였다[21].

#### 7. 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응법(Real-time RT-PCR)

총 mRNA는 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 제조사의 권장방법을 따라 추출하였다. 1 μg의 RNA와 역전사 효소 프라이머 oligo(dT)<sub>18</sub> 을 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA는 thermal cycler(Bio-rad, Hercules, CA)를 이용해 증폭 시켰다. Realtime PCR 은 STEP ONE(Applied Biosystems, Foster City, CA)과 SYBR green premix(Applied Biosystems)을 이용하여 제조사의 지시된 방법에 따라 수행하였고 결과값은 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)의 상대적인 값으로 보정하였다. 증폭된 산물의 특이성은 melting curve 분석을 통하여 확인하였다. DNA 증폭에 사용된 primer는 다음과 같다.

Gene	Sequence
human SREBP-1	(sense) CGACATCGAAGACATGCTTCAG
	(antisense) GGAAGGCTTCAAGAGAGGAGC
human FAS	(sense) GACATCGTCCATTCGTTTGTG
	(antisense) CGGATCACCTTCTTGAGCTCC
human ACC1	(sense) GCTGCTCGGATCACTAGTGAA
	(antisense) CGGATCACCTTCTTGAGCTCC
human SCD-1	(sense) CCTCTACTTGGAAGACGACATTCGC
	(antisense) GCAGCCGAGCTTTGTAAGAGCGGT
human LXRα	(sense) GATCGAGGTGATGCTTCTGGAG
	(antisense) CCCTGCTTTGGCAAAGTCTTC
human Sesn1	(sense) CTTCTGGAGGCAGTTCAAGC
	(antisense) TGAATGGCAGCCTGTCTTCAC
human Sesn2	(sense) AAGCTCGGAATTAATGTGCC
	(antisense) CTCACACCATTAAGCATGGAG
human Sesn3	(sense) GTTCACTGTATGTTTGGAATCAGG
	(antisense) GGGTGATACTTCAGGTCAAATG
mouse Sesn1	(sense) GGACGAGGAACTTGGAATCA
	(antisense)ATGCATCTGTGCGTCTTCAC
mouse Sesn2	(sense) TAGCCTGCAGCCTCACCTAT
	(antisense) TATCTGATGCCAAAGACGCA

#### 8. Transfection

본 실험실의 확립된 방법에 따라 lipofectamine2000 시약을 사용하여 HepG2 세포주에 transfection 하였다. 세포 용해질 내의 luciferase 활성은 luminometer(Promega, Madison, WI)를 사용하여 측정하였다.

#### 9. Oil Red O 염색법

Primary 마우스 간세포를 PBS 로 세척한 후 4% 포르말린 용액으로 1시간 동안 실온에서 고정시켰다. 고정한 세포를 Oil red O로 실온에서 1시간 염색 후 PBS로 세척하고 건조시켜 광학현미경으로 염색 정도를 관찰하였다. 세포 안 지질 생성 정도는 각 well에 300 µl isopropanol을 넣은 후 20분 동안 실온 보관하여 Oil Red O를 추출하여 microplate reader (Versamax, Molecular Device, Sunnyvale, CA)에서 450 nm 파장으로 측정 하였다.

#### 10. 통계처리

데이터는 평균 ±S.E 로 표기하였으며 통계적 유의성은 p<0.05, p<0.01을 기준으로 하였다.

#### Ⅲ. 실험 결과

### 1. Primary hepatocyte 및 HepG2 세포에서 Resveratrol에 의한 지질 축적 및 SREBP-1c 발현 억제효과

본 실험에서는 Primary mice 간세포를 이용하여 resveratrol의 지질축적에 대한 영 향을 평가하였다. Primary mice 간세포에 resveratrol 1시간 전 처리 후 LXRα-agonist인 T090을 처리하고 24시간 배양하였을 때, 지질액포가 증가되었고 이를 resveratrol이 농도 의존적으로 억제하는 것을 전자현미경으로 관찰하였다(Fig. 1A). 위와 같은 결 과는 지질을 특이적으로 염색하는 Oil red O 염색결과를 통해서도 관찰 되었다(Fig. 1B). LXRα에 의해 활성화되는 대표 유전자인 SREBP-1c 발현이 T090에 의하여 증 가되었으며 이는 resveratrol에 의하여 억제 되었다(Fig. 1C)

다음은 HepG2 세포 주를 이용하여 Fig 1과 같은 방법으로 시약 처리 후 SREBP-1c 단백질 발현과 표적 유전자인 ACC, FAS, SCD-1 mRNA level를 관찰하였다. T090 에 의해 증가된 SREBP-1c 단백질 및 mRNA가 resveratrol 놓도 의존적으로 모두 억 제되었다(Fig. 2A and 2B). pGL2-FAS 를 transfection 시킨 후 T090에 의한 resveratrol 의 효과를 FAS luciferase activity를 통해 확인하였다. T090처리에 의하여 luciferase activity가 증가되었으며 resveratrol이 이를 유의적으로 억제하였다(Fig. 2C). FAS, ACC 단백질 발현 또한 resveratrol 처리에 의하여 억제 되었다(Fig. 2D). 다른 폴리페놀류 약물 또한 T090 유도로 인한 SREBP-1c 발현에 영향을 미치는지 확인 하였다. HepG2 세포에 각각의 약물을 30 μM 전 처리 후 T090을 처리 하여 SREBP-1c 단백 질 발현 정도를 확인 하였다. 결과는 resveratrol이 다른 약물들에 비해 더 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 2E).

## 2. LXRα활성과 LXRα 의존적 유전자 전사촉진에 의한 Resveratrol의 억 제효과

Resveratrol를 전처리 하여 LXRα 활성을 관찰하였다. LXRα mRNA level이 T090 처 치에 의하여 증가되었으며 resveratrol 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 3A). LXRE의 oligonucleotide를 사용하여 gel shift assays를 수행한 결과 LXRα-RXRα complex가 LXRE binding site에 결합되어 DNA결합이 증가되었고 resveratrol이 이를 억제 하였

9

다(Fig. 3B). LXRE 활성에 의한 resveratrol의 효능을 관찰하기 위해 resveratrol 전 처 리 후 LXRα-RXRα을 과발현(Fig. 3C. left) 또는 T090처치(Fig. 3C. right) 하여 LXRE promoter luciferase 활성의 변화를 관찰하였다. 두 결과 모두 resveratrol에 의해 억제 되었다(Fig. 3C).

### 3. T090유도로 인한 SREBP-1c 발현과 Resveratrol의 AMPK, SIRT1 비 의존성

다음으로는 resveratrol의 주된 약리효능이 SIRT/AMPK신호를 매개함으로 resveratrol에 의한 LXRa 의존성 SREBP-1c 억제에 있어 SIRT/AMPK 관련여부를 관 찰하였다. AMPK 억제제인 Compound C[23]와 Dominant negative mutant(DN-AMPK) 과발현을 통해 관찰한 결과 resveratrol에 의한 SREBP-1c 발현억제가 이들 처치에 의하여 반전되지 않았다 (Fig. 4A). 이는 resveratrol에 의한 SREBP-1c 억제와 AMPK 신호가 무관함을 보여준다. 또한 SIRT1 억제제인 Sirtinol[22] 과 Nicotinamide를 처 리한 후 resveratrol에 의한 SREBP-1c 발현억제가 극복되지 않았다 (Fig. 4B). 이와 같은 결과는 resveratrol에 의한 AMPK와 SIRT1의 활성화는 T090 유도로 인한 SREBP-1c 발현 억제에 영향을 주지 못함을 시사한다.

#### 4. Sestrin 2의 고지방식이로 인한 지방간 억제

지방간증은 산화적 스트레스, 산화환원 신호와 관련되어 있다[15,24]. 이전 연구 에 따르면 항산화 유전자발현 억제가 비 알코올성 지방간의 발병 및 진행과 직접 적 관련이 있다고 알려져 있다[25]. C57BL/6 mice에 8주 동안 고지방식이와 정상식 이를 행하여 간 샘플을 얻었다. 이를 Real-time PCR 을 통해 *Sesn1,Sesn2* mRNA level 을 확인하였다. 고지방식이군 에서는 *Sesn2* mRNA level이 정상식이군에 비하여 감 소한 반면에, *Sesn1*은 변화하지 않았다(Fig. 5A). 같은 샘플로 Immunoblot을 수행한 결과 *Sesn2* 단백질 발현 또한 감소되는 것을 확인 하였다(Fig. 5B).

#### 5. Resveratrol에 의한 Sesn2발현 효과

이전 연구결과에 의하면 항산화제는 지방간 예방 및 치료 효과가 있음이 알려져 있다. HepG2 세포에 resveratrol을 시간과 농도 의존적으로 처리하여 Immunoblot을 통해 Sesn2 단백질 발현 변화를 관찰 하였다. Resveratrol을 처리 하였을 때 6시간과 12시간에서 Sesn2 발현이 가장 높았다 (Fig. 6A). Resveratrol 처리 3시간 후 RT-PCR 분석결과 Sesn2 mRNA level이 농도 의존적으로 증가 되었다. 그러나 Sesn1과 Sesn3 발현에는 변화가 없었다(Fig. 6B). Sesn2 promoter를 transfection후 resveratrol을 농도 별로 처리 하였다. Resveratrol 농도 의존적으로 Sesn2 promoter 가 증가 되는 것을 확인 하였다(Fig. 6C). 이는 resveratrol이 Sesn2발현을 유도함을 의미한다.

#### 6. Sestrin2에 의한 LXRα의존적 SREBP-1c 발현억제

Resveratrol에 의해 유도된 Sesn2이 T090자극을 통해 증가된 SREBP-1c활성에 영 향을 미치는지를 조사하였다. Sesn2를 24시간 동안 과발현 후 T090을 처리하여 SREBP-1c 발현을 관찰 한 결과 SREBP-1c 발현이 Sesn2농도 의존적으로 감소 되었 다(Fig. 7A). Sesn2를 과 발현 시킨 결과 LXRα/RXRα에 의해 증가된 LXRE luciferase 활성은 완전히 억제 되었다(Fig. 7B). 이는 Sesn2발현의 증가가 LXRα 활성화로 인한 SREBP-1c 매개성 지질형성을 억제함을 의미한다.

#### Ⅳ. 고찰 및 결론

세포생장에 필수적인 지질대사의 항상성조절은 지질합성과 분해에 의해 정교하게 이루어지며 이를 위해 지질농도를 탐지하는 세포 내 센서를 필요로 한다. 이와 관련하여, 지질과 내분비 호르몬에 대한 세포 내 센서로 작용하는 핵 수용체는 탄수화물 및 지질 대사를 조절하는 중요한 요소라 여겨진다[26]. LXRs 는 콜레스테롤 대사 및 지질 생합성을 조절하며 리간드에 의해 활성화되는 핵 수용체 superfamily 의 일종이다. 보고된 바에 의하면 LXRα mRNA 발현이 비 알코올성 지방간 질병 동물모델에서 상당히 증가 되었고[27], 이는 통계적으로 LXRα 의 발현과 비 알코올성 지방간의 발병 및 진행과 상관관계가 있음을 의미한다[28]. 합성된 LXRα agonist T090 을 쥐에 투여하면 간에서 지방이 축적되고 VLDL-TG 가 분비 된다[5]. LXRα 유도로 인한 지방간은 SREBP-1 에 의해 조절되는 지질유전자 발현을 통한 간 조직 내 지질축적으로 설명 되어진다(FAS, ACC, SCD-1)[2]. 본 연구에서는 폴리페놀류인 resveratrol 이 LXRα 를 불활성화함으로 SREBP-1c 발현을 억제하고 이에 따른 SREBP1-1c 표적 유전자를 억제함을 증명하였다 (Fig 1, 2 and 3).

Resveratrol 은 대사, 신장질환 암 등을 개선하여 건강에 좋은 영향을 주는 것으로 알려져 있다. SIRT1, LKB1, AMPK 는 대사활성에 있어 resveratrol 의 중요한 분자신호이다. 이전 연구 결과에 의하면 resveratrol 효과는 SIRT1, LKB1, AMPK 신호경로에 의존적이라 알려져 왔다[29,30]. 하지만 본 연구에서는 AMPK 와 SIRT1 을 억제하기 위하여 화학적 억제제와 mutant 된 플라스미드를 사용하여 본 결과 이들 억제제 및 플라스미드는 resveratrol 에 의한 LXRα 매개성 SREBP-1c 발현 억제에 영향을 미치지 않았다. 본 연구 결과는 resveratrol 에 의한 LXRα 매개성 SREBP-1c 발현 억제효과에 있어 SIRT1 과 AMPK 활성화와는 무관함을 보여준다(Fig 4).

산화적 스트레스는 비 알코올성 지방간질병에서 지방간으로 발전하는데 있어 일종의 second hit 개념의 주요한 요소가 된다. 산화환원 상태의 불균형과 지나친 산화적 스트레스 상태는 세포 안 신호와 에너지 대사를 변질시킨다. 축적된 유리 지방산의 β-산화가 과도하게 진행되면 간 세포에 과량의 활성 산소종 (ROS)을 생성한다. 더욱이 활성 산소종은 염증 매개물질 생산을 자극한다. 비 알코올성

12

지방간 질병 환자들에게서 항산화 유전자 활성이 감소된다는 연구 결과가 위의 사실을 뒷받침 한다[17]. 또한 본 연구팀에서는 이전 연구에서 고지방식이를 하면 간에서 항산화 효소수치와 니트로 타이로신 효소가 증가되고 glutathione (GSH) level 은 감소 된다고 밝힌 바 있다[31]. LXRa 활성은 β 세포에서 지질 축적과 apoptosis 를 유도하는 활성 산소종을 증가 시킨다[32]. Resveratrol 은 자유 라디칼의 robust scavenger 로서 항산화 작용을 가진다고 알려져 있다[33]. Resveratrol 을 처리 하면 간 세포에서 AA+iron 로 유도된 apoptosis, 활성 산소종, GSH 고갈 등이 억제 된다[34]. 또한, resveratrol 은 미토콘드리아의 초과산화물을 감소 시키고 AA+iron 로 유도된 미토콘드리아의 기능장애를 회복시킨다. 본 연구에서는 신규 항산화 유전자인 *Sesn2* level 이 고지방식이 마우스 간 조직에서 정상식이 마우스보다 감소된다는 결과를 얻었다. 또한 우리는 resveratrol 이 간 세포에서 *Sesn2* 발현을 증가 시키는 반면에 *Sesn1*과 *Sesn3*는 영향이 없다는 사실을 관찰하였다(Fig 6).

Sestirin 은 다양한 스트레스 반응에 의한 세포 안에 축적된 항산화 효소로, 세가지 human isoform 이 존재한다고 알려져 있다. 비록 sulfinyl 환원효소로서의 Sesn2 의 역할은[35]. 논란이 있지만 hydrogen peroxide 또는 UV 와 같은 자극에 대한 세포보호를 가진다[36]. 최근 본 연구실에서 밝힌 Nrf2-ARE 신호경로는 Sesn2 유전자 발현에 필수적이며 이는 산화적 스트레스에 의한 세포 보호 작용을 조절하였다[19]. Resveratrol 은 몇몇 세포 안에서 Nrf2 전사적 활성을 증가 시킨다[37]. Nrf2 는 FXR 활성화 및 FXR 의 전사적 costimulator 인 p300 과 경쟁함으로 LXRa 활성과 LXRa 에 매개된 지방간을 억제 시킨다[38]. Sesn2 가 knockout 된 비만 쥐에서는 대조군과 비교했을 때 간에 지방이 축적이 더 증가된다[39].

결론적으로 resveratrol 은 간 세포에서 AMPK/SIRT1 비 의존적으로 LXRα 매개성 SREBP-1c 발현을 억제시키고, 이로 인한 간세포 내 지질축적을 억제한다. 또한 resveratrol 은 LXRα의 mRNA level, DNA 결합, 전사적 활성화를 억제하였다. 더 나아가 지방간 동물모델에서 *Sesn2* 발현이 정상 동물에 비해 감소 되어 있음을 발견하였고 resveratrol 이 항산화 단백질인 *Sesn2* 발현을 증가시켜 LXRα 매개성 간세포 내 지질생성을 억제함을 규명하였다. 그러므로 본 연구결과 *Sesn2* 가 비 알코올성 지방간에 대한 새로운 치료 타겟이 될 수 있음을 제시한다.

13

A)

B)



T090+Res 10 μM T090+Res 30 μM

Control





Control





T090+Res 10 μM

T090+Res 30 μM

C) T090 10 30 (µM) Res 0 0 SREBP-1 β-actin



# Figure 1. Resveratrol inhibits T090-induced triglyceride accumulation in primary hepatocytes.

A) Morphological characterization of primary hepatocytes under phase contrast of microscopy. After 24 h of incubation with T0901317 (T090, 10  $\mu$ M) following resveratrol (Res) pretreatment (1 h), cells were observed and morphological changes were investigated using a phase contrast microscope.

**B)** Oil Red O staining. Primary hepatocytes were incubated with T090 for 24 h following Res pretreatment (1 h). Cells were fixed and stained with Oil red O and observed under a microscope. The Oil Red O stained cells were treated with isopropanol for the extraction of the dye, and the absorbance at 450 nm was measured. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of 4 replicates; the statistical significance of differences between each treatment group and the control (<sup>#</sup>p<0.05, <sup>##</sup>p<0.01) or T090 without resveratrol (\*\*p<0.01) was determined.

**C)** Effect of resveratrol on T090-induced SREBP-1c induction. Immunoblots were performed on the lysates of primary hepatocytes treated with resveratrol for 1 h with with subsequent exposure to T090 for 12 h.





SREBP-1



))

#### Figure2. Resveratrol inhibits T090-induced SREBP-1c induction and its target genes.

A) Immunoblots were performed on the lysates of cells treated with resveratrol for 1 h with subsequent exposure to T090 (upper) or GW3965 (10  $\mu$ M) for 12 h.

**B)** Real-time RT-PCR assays. HepG2 cells were treated with vehicle or T090 in combination with resveratrol for 12 h. The transcripts of lipogenic genes were analyzed by real-time RT-PCR assays, with the mRNA level of GAPDH used as a normalizing reference. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of 4 replicates. The statistical significance of differences between each treatment group and the control (<sup>##</sup>p<0.01) or T090 without resveratrol (\*p<0.05, \*\*p<0.01) was determined.

C) Resveratrol inhibition of T090-induced FAS gene transactivation. FAS luciferase activi ty was assessed on the lysates of HepG2 cells that had been treated as described in the legend to Figure 2B. The statistical significance of differences between each treatment group and the control ( $^{\#}p$ <0.01) or T090 alone (\*\*p<0.01) was determined.

**D)** The effects of resveratrol on the induction of FAS and ACC by T090. FAS and AC C were immunoblotted from the lysates of HepG2 cells treated with T090 for 12 h follo wing a resveratrol pretreatment (1 h).

**E)** Immunoblots were performed on the lysates of cells treated with resveratrol, daidzein or genistein for 1 h with subsequent exposure to T090 for 12 h.



B)

#### Figure3. Resveratrol inhibits LXRa activation and LXRa-dependent LXREluciferase activity.

A) Real-time RT-PCR assays. HepG2 cells were treated as described in the legend to F igure 2B. LXR $\alpha$  mRNA was analyzed by real-time RT-PCR assays. The statistical signif icance of differences between each treatment group and the control (\*p<0.05) or T090 without resveratrol (\*\*p<0.01) was determined.

**B)** Gel shift analysis of LXR $\alpha$  and RXR $\alpha$  binding to the LXRE binding site. HepG2 ce lls were treated with Resveratrol for 3 h after transfection of plasmids encoding for LX R $\alpha$  and RXR $\alpha$ .

C) LXRE-luciferase activity. LXRE-luciferase transactivation was determined from the ly sates of HepG2 cells treated with T090 for 12 hours and/or resveratrol pretreatment for 1 h (left). LXRE luciferase activity was measured in the lysates of HepG2 cells treated with resveratrol for 12 h after transfection of plasmids encoding for LXR $\alpha$  and RXR $\alpha$  (right). The statistical significance of differences between each treatment group and the control (\*p<0.05, \*\*p<0.01) or T090 or LXR $\alpha$  and RXR $\alpha$  transfection without resveratrol (\*p<0.05, \*\*p<0.01) was determined.

A)





Sirtinol (10 µM)





# Figure4. Resveratrol's effects on LXRα-mediated SREBP-1c repression were independent on SIRT1 and AMPK activation.

A) The role of AMPK in SREBP-1c repression by resveratrol. SREBP-1c was immunoblotted from the lysates of cell populations treated with T090 or T090 plus resveratrol (30  $\mu$ M) for 12 h after AMPK inhibitor compound C (5  $\mu$ M) pretreatment for 1 h (left) or transfection of plasmids encoding for DN-AMPK (right). Data represent the mean ± S.E. of 3 replicates; the statistical significance of differences between each treatment group and the control (\*p<0.05, \*\*p<0.01) or T090 alone or DN-AMPK transfection without resveratrol (<sup>##</sup>p<0.01) was determined.

**B)** The role of Sirt1 in SREBP-1c repression by resveratrol. SREBP-1c was immunoblotted from the lysates of cell populations treated T090 or T090 plus resveratrol (30  $\mu$ M) for 12 h after Sirt1 inhibitor Sirtinol (10  $\mu$ M) or nicotinamide (NAM, 10 mM) pretreatment for 1 h. Data represent the mean ± S.E. of 3 replicates; the statistical significance of differences between each treatment group and the control (\*\*p<0.01) or T090 alone or DN-AMPK transfection without resveratrol (<sup>##</sup>p<0.01) was determined.





A)



#### Figure 5. Sestrin2 levels were down-regulated in HFD-induced fatty liver.

**A)** Real-time PCR assays for sestrin (sesn) mRNA. Male C57BL/6 mice were fed on either a normal diet (ND) or high-fat diet (HFD) for 8 weeks. The mRNA level of GAPDH was used as a reference for data normalization.

**B)** Representative immunoblot analysis for *Sesn2* in the homogenates of liver tissue. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of all mice; the statistical significance of differences between ND and HFD-fed mice (\*\*P < 0.01).



#### Figure6. Resveratrol up-regulated the expression of *Sesn2* in hepatocytes.

A) The effect of resveratrol on the expression of *Sesn2* in hepatocytes. *Sesn2* protein was immunoblotted in the lysates of cells incubated with 30  $\mu$ M of resveratrol for 1-12 h (upper) or 30  $\mu$ M of resveratrol for 12 h.

**B)** HepG2 cells were treated with resveratrol for 3 hours. The transcripts of *Sesn2* (upper), *Sesn1* (middle) and *Sesn3* (lower) genes were analyzed by RT-PCR assays.

C) Increase in *Sesn2* transactivation by resveratrol. *Sesn2* luciferase assays were performed on the lysates of cells exposed to 10 or 30  $\mu$ M resveratrol in HepG2 cells. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of four separate experiments; the statistical significance of differences between each treatment group and the control (\*\*P < 0.01).

A)



#### Figure 7. The role of *Sesn2* in the LXRα-mediated SREBP-1c induction.

A) SREBP-1c was immunoblotted from the lysates of cell populations treated with T090 following *Sesn2* transfection for 24 h. The statistical significance of differences between each treatment group and the control (p<0.05, p<0.01) or T090 alone (p<0.05, p<0.01) was determined

**B)** LXRE-luciferase activity. LXRE luciferase activity was measured in the lysates in H epG2 cells after transfection of plasmids encoding for LXR $\alpha$  and RXR $\alpha$ . The statistical significance of differences between each treatment group and the mock treansfected (<sup>##</sup> p<0.01) or LXR $\alpha$  and RXR $\alpha$  transfected (\*p<0.05, \*\*p<0.01) was determined.

#### V. 참고문헌

- Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R, et al. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. J Biol Chem 2002;277:11019-11025.
- [2]. Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:11245-11250.
- [3]. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. Nat Med. 2002;8:1243-1248.
- [4]. Zhao C, Dahlman-Wright K. Liver X receptor in cholesterol metabolism. J Endocrinol. 2010;204:233-240
- [5]. Grefhorst A, Elzinga BM, Voshol PJ, Plösch T, Kok T, Bloks VW, van der Sluijs FH, Havekes LM, Romijn JA, Verkade HJ, Kuipers F. Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. J Biol Chem. 2002;277:34182-34190.
- [6]. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B. Role of LXRs in control of lipogenesis. Genes Dev. 2000;14:2831-2838.
- [7]. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. Genes Dev. 2000;14:2819-2830.
- [8]. Steffensen KR, Gustafsson JA. Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR).

Diabetes. 2004 ;53 Suppl 1:S36-42.

- [9]. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid Med Cell Longev. 2009;2:270-278. Review.
- [10].Baur JA, Baur DA, Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. Nat Rev Drug Discov. 2006;5:493-506.
- [11].Tennen RI, Michishita-Kioi E, Chua KF. Finding a target for resveratrol. Cell. 2012;148:387-389.
- [12]. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. Cell. 2006;127:1109-1122.
- [13]. Danz ED, Skramsted J, Henry N, Bennett JA, Keller RS. Resveratrol prevents doxorubicin cardiotoxicity through mitochondrial stabilization and the Sirt1 pathway. Free Radic Biol Med. 15;46:1589-1597.
- [14].Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, Ido Y. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. J Biol Chem. 2008;283:27628-27635.
- [15].Oliveira CP, da Costa Gayotto LC, Tatai C, Della Bina BI, Janiszewski M, Lima ES, Abdalla DS, Lopasso FP, Laurindo FR, Laudanna AA. Oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, in rats fed with a choline-deficient diet. J Cell Mol Med. 2002;6:399-406.
- [16]. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. J Clin Invest. 2004;114:147-152. Review
- [17]. Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quiñones L, Varela N, Contreras J, Lazarte R, Csendes A, Rojas J, Maluenda F, Burdiles P, Diaz JC, Smok G,

Thielemann L, Poniachik J. Oxidative stress-related parameters in the liver of nonalcoholic fatty liver disease patients. Clin Sci (Lond). 2004;106:261-268.

- [18].Budanov AV, Shoshani T, Faerman A, Zelin E, Kamer I, Kalinski H, Gorodin S, Fishman A, Chajut A, Einat P, Skaliter R, Gudkov AV, Chumakov PM, Feinstein E. Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability. Oncogene. 2002;21:6017-6031.
- [19].Shin BY, Jin SH, Cho IJ, Ki SH. Nrf2-ARE pathway regulates induction of Sestrin-2 expression. Free Radic Biol Med. 2012 ;53:834-41.
- [20]. Kay HY, Won Yang J, Kim TH, Lee da Y, Kang B, Ryu JH, Jeon R, Kim SG. Ajoene, a stable garlic by-product, has an antioxidant effect through Nrf2-mediated glutamatecysteine ligase induction in HepG2 cells and primary hepatocytes. J Nutr. 2010;140:1211-1219.
- [21].Hwahng SH, Ki SH, Bae EJ, Kim HE, Kim SG. Role of adenosine monophosphateactivated protein kinase-p70 ribosomal S6 kinase-1 pathway in repression of liver X receptor-alpha-dependent lipogenic gene induction and hepatic steatosis by a novel class of dithiolethiones. Hepatology. 2009 ;49:1913-1925.
- [22]. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan. Nature. 2003;425:191-196.
- [23].Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA, Zuccollo A, Hou X, Jiang B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Cohen RA. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. Diabetes. 2006;55:2180-2191.
- [24]. Zhu H, Jia Z, Misra H, Li YR. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of alcoholic liver disease: updated experimental and clinical evidence. J Dig Dis.

2012;13:133-142.

- [25]. Yang S, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson K, Trush MA, Diehl AM. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. Arch Biochem Biophys. 2000;378:259-268.
- [26]. Vacca M, Degirolamo C, Mariani-Costantini R, Palasciano G, Moschetta A. Lipid-sensing nuclear receptors in the pathophysiology and treatment of the metabolic syndrome. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2011;3:562-587.
- [27]. Ai ZL, Chen DF. The significance and effects of liver X receptor alpha in nonalcoholic fatty liver disease in rats. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. 2007;15:127-130.
- [28]. Higuchi N, Kato M, Shundo Y, Tajiri H, Tanaka M, Yamashita N, Kohjima M, Kotoh K, Nakamuta M, Takayanagi R, Enjoji M. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatol Res. 2008;38:1122-1129.
- [29].Kitada M, Kume S, Imaizumi N, Koya D. Resveratrol improves oxidative stress and protects against diabetic nephropathy through normalization of Mn-SOD dysfunction in AMPK/SIRT1-independent pathway. Diabetes. 2011;60:634-643.
- [30]. Mader I, Wabitsch M, Debatin KM, Fischer-Posovszky P, Fulda S. Identification of a novel proapoptotic function of resveratrol in fat cells: SIRT1-independent sensitization to TRAIL-induced apoptosis. FASEB J. 2010;24:1997-2009.
- [31]. Han CY, Ki SH, Kim YW, Noh K, Lee da Y, Kang B, Ryu JH, Jeon R, Kim EH, Hwang SJ, Kim SG. Ajoene, a stable garlic by-product, inhibits high fat diet-induced hepatic steatosis and oxidative injury through LKB1-dependent AMPK activation. Antioxid Redox Signal. 2011;14:187-202.
- [32].Choe SS, Choi AH, Lee JW, Kim KH, Chung JJ, Park J, Lee KM, Park KG, Lee IK, Kim JB. Chronic activation of liver X receptor induces beta-cell apoptosis through hyperactivation of lipogenesis: liver X receptor-mediated lipotoxicity in pancreatic beta-

cells. Diabetes. 2007; 56:1534-1543.

- [33].Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, Shi X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. Biochem Biophys Res Commun. 2003;309:1017-1026.
- [34]. Shin SM, Cho IJ, Kim SG. Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMP-activated protein kinase-mediated glycogen synthase kinase-3beta inhibition downstream of poly(ADP-ribose)polymerase-LKB1 pathway. Mol Pharmacol. 2009;76:884-895.
- [35]. Woo HA, Bae SH, Park S, Rhee SG. Sestrin 2 is not a reductase for cysteine sulfinic acid of peroxiredoxins. Antioxid Redox Signal 2009;11:739-45.
- [36].Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakov PM. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated *Sestrins*, homologs of bacterial AhpD. Science 2004;304:596-600.
- [37]. Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. Eur J Pharmacol 2008;591:66-72.
- [38].Kay HY, Kim WD, Hwang SJ, Choi HS, Gilroy RK, Wan YJ, et al. Nrf2 inhibits LXRαdependent hepatic lipogenesis by competing with FXR for acetylase binding. Antioxid Redox Signal 2011;15:2135-46.
- [39].Lee JH, Budanov AV, Talukdar S, Park EJ, Park HL, Park HW, et al. Maintenance of metabolic homeostasis by *sestrin2* and sestrin3. Cell Metab 2012;16:311-21.